

30.10.03

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

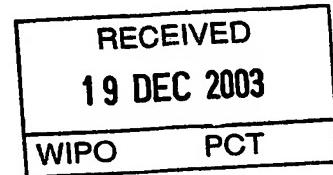
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年11月 1日

出願番号
Application Number: 特願2002-320044

[ST. 10/C]: [JP2002-320044]

出願人
Applicant(s): 浜松ホトニクス株式会社

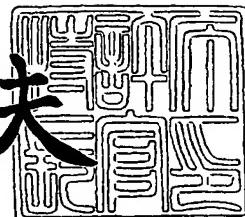


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 2002-0535

【提出日】 平成14年11月 1日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/48

G01N 21/64

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホトニク
ス株式会社内

【氏名】 角井 昭充

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホトニク
ス株式会社内

【氏名】 本澤 克

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県浜松市市野町1126番地の1 浜松ホトニク
ス株式会社内

【氏名】 佐藤 由紀子

【特許出願人】

【識別番号】 000236436

【氏名又は名称】 浜松ホトニクス株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088155

【弁理士】

【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【選任した代理人】

【識別番号】 100089978

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩田 辰也

【選任した代理人】

【識別番号】 100092657

【弁理士】

【氏名又は名称】 寺崎 史朗

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014708

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 疾患判定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 生体試料から成る検体を用いて疾患を判定する方法であって

前記検体に酸又はアルカリを添加して加熱する前処理工程と、

前記検体に励起光を照射し且つ該励起光の波長を連続的又は断続的に変化させる励起光照射工程と、

前記励起光に起因して前記検体から発せられる出射光の波長及び強度を計測する出射光計測工程と、

前記励起光の波長、前記出射光の波長、及び該出射光の強度から構成される三次元光スペクトルにおける特異点を検出し、該特異点の属性に基づいて前記検体の分類又は階層化を行う解析・分類工程と、

前記検体の分類又は階層化結果に基づいて、該検体が帰属する生体における前記特定の疾患の有無又は該疾患の状態を判定する判定工程と、
を備える疾患判定方法。

【請求項 2】 前記解析・分類工程においては、前記特異点の波長座標、該特異点の数、該特異点における前記出射光の強度、該特異点の周囲における該出射光強度の変化割合、及び前記三次元光スペクトルの形状のうち少なくともいずれか一つのパラメータによって該特異点の属性を決定する、

請求項 1 記載の疾患判定方法。

【請求項 3】 前記検体として尿を用いる、請求項 1 又は 2 に記載の疾患判定方法。

【請求項 4】 前記出射光として蛍光を計測する、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の疾患判定方法。

【請求項 5】 前記励起光照射工程においては、前記励起光として 200～900 nm の範囲内のいずれかの波長を有する光を用い、

前記出射光計測工程においては、前記出射光として 200～900 nm の範囲内のいずれかの波長を有する蛍光を計測する、

請求項 1～4 のいずれか一項に記載の疾患判定方法。

【請求項 6】 前記前処理工程を実施した後に、前記検体の液性を調整する液性調整工程を更に備える、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の疾患判定方法。

【請求項 7】 前記液性調整工程においては、前記検体の液性を酸性、アルカリ性、及び、中性又は略中性のうちから任意に選択し、該選択した液性となるように該検体に酸、アルカリ、又は緩衝剤を添加する、
請求項 6 記載の疾患判定方法。

【請求項 8】 前記解析・分類工程においては、前記三次元光スペクトルにおける前記出射光の強度の極大ピークを前記特異点とする、
請求項 1～7 のいずれか一項に記載の疾患判定方法。

【請求項 9】 前記解析・分類工程においては、前記三次元座標系における数値マトリックス、等高線図、又はベクトル線図から成る特異点検出用マップを作成し、該特異点検出用マップに基づいて、前記特異点を特定する、
請求項 8 記載の疾患判定方法。

【請求項 10】 前記解析・分類工程においては、種類の判明している特定の疾患有する生体からの基準検体を用いて予め検出された特異点の既知の属性と、前記判定対象の検体に対して得た特異点の属性とを比較し、該比較結果に基づいて前記検体の分類を行う、
請求項 1～9 のいずれか一項に記載の疾患判定方法。

【請求項 11】 前記特定の疾患が悪性腫瘍である、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の疾患判定方法。

【請求項 12】 前記液性調整工程においては、前記検体の液性をアルカリ性に保持する、請求項 11 記載の疾患判定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、疾患判定方法に関し、詳しくは、生体の尿検体を検査して例えば悪性腫瘍等の特定の疾患を判定するための方法に関する。

【0002】**【従来の技術】**

ヒトが疾患を有するか否かを判定したり、或いはその疾患の進行状況について診断する方法としては、被験者の生体を非破壊的に検査するほか、生体試料を分析・検査する方法が広く用いられている。後者の方針としては、特定の疾患に起因して生体内で生成し得る特有の化学物質を生化学的指標として定性・定量する方法が一般的に用いられている。

【0003】

特定疾患が悪性腫瘍（ガン）の場合、ヒトの尿や生体液中のポリアミンやプロテリンを生化学的指標として用いることが臨床的に有意義であるとの指摘がなされている。また、より有用な指標物質として天然プロテリジンであるオンコプロテリンを用いる方法も提案されている（例えば、特許文献1参照。）。当該方法は、患者から採取した尿を酸で加水分解処理して得た検体試料をHPLC分析に供し、その検体中のオンコプロテリンを選択的に分離して定量する方法である。

【0004】

すなわち、(i) 検体試料をアニオニン交換カラムに通じ、洗浄後、電解質溶液で溶出し、(ii) 溶出液をカチオニン交換カラムに通じ、洗浄後、酸性溶液で溶出し、必要に応じて逆相カラムにかけてオンコプロテリンを単離し、(iii) その溶出液中のオンコプロテリンに起因する蛍光発光強度を測定し、(iv) その強度から検量線を用いてオンコプロテリン含有量を算出する。

【0005】

そして、このような分析操作を、悪性腫瘍の疑われる被験者及び健常者（悪性腫瘍等の疑われる疾患を有していないヒト；以下同様）の尿検体に対して実施し、被験者の尿中のオンコプロテリン含有量が健常者のそれよりも有意に多いときに、悪性腫瘍又はその可能性があるとの判定をなし得る。

【0006】**【特許文献1】**

特開平6-199859号公報

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

ところで、悪性腫瘍患者の尿中には、上述したように悪性腫瘍特有の種々の有機物が含まれ、また多数の未知の物質も含まれている可能性が多分にある。これらの有機物の多くは、自家蛍光成分であると考えられる。これに対し、上記従来の方法は、尿検体中のオンコプテリンを単離してそれから発せられる蛍光のみを測定する方法であって、換言すれば、疾患を判定するための指標物質として一種のみを用いる方法である。

【0008】

しかし、かかる方法を用いると、尿中に含まれ得る他の自家蛍光物質の情報が全く得られない。そのため、場合によっては、判定精度・確度が不十分となり、臨床上の診断方法としては不十分なおそれがある。具体的には、感度（疾患を疾患と判定する割合）又は特異度（非疾患を非疾患と判定する割合）が不都合に低下するおそれ、逆に言えば、偽陰性率（疾患であるのに疾患ではないと診断される率）又は偽陽性率（疾患でないのに疾患であると診断される率）が不都合に高まるおそれがある。さらに、オンコプテリンのみを指標物質とするので、種々のガン判定に対する汎用性又は適合性が不十分となり得る。また、尿の前処理で生じ得る希釈誤差や化学分離に起因する化学収率誤差の影響を受けて判定精度が低下するおそれもある。

【0009】

また、尿検体を前処理するだけでなく、その検体試料を更にHPLCに供し、複数のカラム操作を行った後に蛍光測定を実施するので、判定作業に掛かる手間と時間が増大してしまう傾向にある。しかも、オンコプテリン含有量の絶対値測定を行うが故に蛍光測定系毎に検量線作成が必要となる可能性も高い。かかる作業を考慮すると、判定作業に総合的に要する時間と手間が更に増大してしまう傾向にある。

【0010】

そこで、本発明はかかる事情に鑑みてなされたものであり、生体からの検体を用いて特定の疾患を判定するに際し、その判定精度を向上できると共に、種々の疾患の判定に適用でき、しかも、判定作業を迅速化できる疾患判定方法を提供す

ることを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために、本発明者らは、健常者及び悪性腫瘍患者の生体試料、特に尿検体を用いて鋭意研究を重ねた結果、特定の化学成分を単離して定性・定量しなくとも、その尿検体が帰属する生体に悪性腫瘍が存在するか否かを簡便に且つ高い精度で判定可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0012】

すなわち、本発明による疾患判定方法は、生体試料から成る検体を用いて疾患を判定する方法であって、検体に酸又はアルカリを添加して加熱する前処理工程と、検体に励起光を照射し且つ励起光の波長を連続的又は断続的に変化させる励起光照射工程と、励起光に起因して検体から発せられる出射光の波長及び強度を計測する出射光計測工程と、励起光の波長、出射光の波長、及び出射光の強度から構成される三次元光スペクトルにおける特異点を検出し、その特異点の属性に基づいて検体の分類又は階層化を行う解析・分類工程と、検体の分類又は階層化結果に基づいて、その検体が帰属する生体における特定の疾患の有無又は疾患の状態（種類、程度、進行度、緊急度等）を判定する判定工程とを備える。

【0013】

このような構成の疾患判定方法では、ヒト等の生体から採取された検体を前処理工程において酸又はアルカリで加熱処理することにより、検体に含まれる生化学成分の一部又は全部が加水分解等の化学変化を生じ得る。こうして前処理された検体に対して種々の所定波長を有する励起光を照射すると、生化学成分のうち自家発光物質の分子が励起され、その電子遷移に固有な波長を有する光（主として蛍光）が放出される。

【0014】

こうして検体から発せられる出射光の波長及び強度は、検体中の自家発光成分の種類及び含有量、並びに励起光の波長及び強度に依存して変化し、出射光計測工程において、その波長及び強度が測定される。すなわち、照射される励起光の波長に対して出射光の波長及び強度が計測されるスペクトロメトリが実施され、

三次元光スペクトルが得られる。

【0015】

次に、解析・分類工程では、得られた三次元光スペクトルの結果に基づいて、励起光波長、出射光波長、及び出射光強度を系成分とする三次元座標系における特異点、例えば、出射光強度が周囲に比して大きい部位（具体的には、ピーク位置、極大値位置等を例示できる。）が検出され、例えばその波長座標によって特異点が特定される。それから、特異点（複数ある場合には各特異点）の属性情報を基に、対応する検体が所定のグループに分類又は階層分けされる。

【0016】

ここで、特異点の属性とは、例えば特異点の波長座標、特異点の数、特異点における出射光の強度、特異点の周辺における出射光強度の変化割合、三次元光スペクトルの全体形状（近似関数形、一次微分や二次微分値の変化、極大ピークの半値幅や十分の一倍、ピーク対称性等）が挙げられ、解析・分類工程においては、これらのうち少なくともいずれか一つのパラメータによって特異点の属性を決定すると好適である。なお、属性としての「特異点の数」は、特異点が0の場合と特異点が1以上ある場合とを含む概念、すなわち、「特異点の有無」を含むパラメータである。

【0017】

本発明者らは、多数の尿検体（疾患の有無が既知の検体）について得られた種々の三次元光スペクトルに顯れた特異点について、これらのパラメータを適用して属性を決定した。そして、同等の属性を有する特異点を示した尿検体を同一の検体グループに分類したところ、健常者の検体と患者の検体とを高感度に弁別（差別化）できることが判明した。また、これらの属性決定用パラメータは、互いに独立なパラメータであるため、これらのパラメータを適宜の順序で特異点の弁別に使用することにより、検体の系統的な階層分類が実現される。

【0018】

そして、判定工程において、その分類又は階層化結果に基づいて、その検体が帰属する生体が特定の疾患を有するか否か、或いは有するとすればその疾患の状態について判定が行われる。つまり、尿検体中の特定成分を、化学的に単離した

り、或いは出射光の波長及び強度から定性・定量したりすることなしに、悪性腫瘍等の特定の疾患について簡便な判定が行われる。

【0019】

ここで、本発明で使用できる検体としては、血清、血漿、尿、髄液、羊水、腹水、リンパ液等の通常の体外診断において採取される全ての生体試料、さらに組織や細胞の溶媒等による洗浄液及び抽出液等が挙げられ、それらのなかでも、尿及び血清が好ましく使われる。これらの内、採血と異なり痛みを伴わずに採取される点、及び出射光の計測による三次元スペクトロメトリの成立性が高く本発明に適している点より、尿を用いると特に好ましい。

【0020】

また、出射光の強度を、ある励起光波長及び出射光波長における出射光強度で規格化するといったデータ補正を行うことが望ましい。こうすれば、検体が複数あるときに、検体間で出射光の強度比較を行う際に、各個人の生理的変動に伴う蛍光測定試料中の検体濃度の相違を相殺することができる。また、かかる補正方法は、これに制限されず、例えば、同一尿中に含まれるクレアチニン等の既知物質の濃度で規格化するといった手法を採用してもよい。

【0021】

また、上述の如く、検体からの出射光は主として自家発光成分に起因すると考えられるため、出射光として蛍光を計測することが望ましい。さらに、励起光照射工程においては、励起光として好ましくは200～900nm、より好ましくは300～600nmの範囲内のいずれかの波長を有する光を用い、出射光計測工程においては、出射光として好ましくは200～900nm、より好ましくは350～600nmの範囲内のいずれかの波長を有する光を計測すると有用である。

【0022】

またさらに、前処理工程を実施した後に検体の液性を調整する液性調整工程を更に備えると好ましく、その液性調整工程においては、検体の液性を酸性、アルカリ性、及び、中性又は略中性のうちから任意に選択し、その選択した液性となるように検体に酸、アルカリ、又は緩衝剤を添加すると一層好ましい。

【0023】

本発明者らの知見によれば、前処理工程を施しただけで励起光を照射しても自家発光が有意に観測されなかった尿検体の液性をアルカリ性（pH領域のアルカリ性又はpH領域を超えるようなより高いアルカリ濃度）となるように調整したところ、自家発光が顕著に観測されることがあった。また、他の尿検体の中には、アルカリ性としたとき、酸性にしたとき、中性又は略中性にしたときで、自家発光による出射光の波長や強度が変化するものも認められた。これらより、前処理工程を施した尿検体に更に液性調整を施すこと、及び、その液性を適宜選択することの有用性が確認された。例えば、前処理工程のみを実施した検体を用いても疾患の判定が困難なときに、その検体を適宜、アルカリ性、中性又は略中性、酸性へと変化させ、それらの三次元スペクトロメトリで得られた各結果を複合的且つ相補的に用いると有用な場合がある。

【0024】

さらにまた、尿検体には疾患に起因する固有の自家発光成分が多種存在すると考えられ、それらのなかで分子骨格が共通するものは発光波長が近似すると想定される。この場合、三次元光スペクトルにおいては、かかる自家発光成分又はその群からの特定波長の発光ピークが観測され得る。そこで、解析・分類工程においては、三次元光スペクトルにおける出射光の強度の極大ピークを特異点とすることが好ましい。

【0025】

ただし、自家発光成分の官能基の相違によるピークシフト、発光過程における緩和、自家発光の試料内における非弾性散乱等に起因して、三次元光スペクトル中にシャープな発光ピークが認められない可能性がある。そこで、上述したように、解析・分類工程においては、三次元座標系における出射光の強度が周囲から有意に突出した励起光及び出射光の波長座標を特定するとより好適である。こうすれば、一般のスペクトロメトリで用いられるピーク解析に多用されるような関数フィッティングの適用が困難な場合、例えば出射光の強度分布が関数近似できない程にブロード又は非対称な場合でも、特異点を検出・特定し易くなる。

【0026】

具体的には、解析・分類工程においては、三次元座標系における数値マトリックス、等高線図、又はベクトル線図から成る特異点検出用マップを作成し、その特異点検出用マップに基づいて特異点を特定すると好適である。

【0027】

ここで、「数値マトリックス」の例としては、二次元マトリックスの一方要素（例えば‘行’）を励起光波長とし且つ他方要素（例えば‘列’）を出射光波長とし、その行列成分として出射光強度の数値を有する行列が挙げられる。これを用いると、例えば、 3×3 のマトリックス上で周囲の複数（例えば8つ）の行列成分より数値が大きい位置（波長座標）に特異点が存在すると特定される。

【0028】

また、「等高線図」の例としては、二次元座標の一方軸を励起光波長とし且つ他方軸を出射光波長とし、出射光強度の等しい座標を結んでできる平面線図が挙げられる。これを用いると、例えば、閉じた複数の曲線の内部中心又はその付近の位置（波長座標）に特異点が存在すると特定される。

【0029】

さらに、「ベクトル線図」とは、二次元マトリックスの一方要素（例えば‘行’）を励起光波長とし且つ他方要素（例えば‘列’）を出射光波長とし、その行列成分として出射光強度の増大する方向を有するベクトルを線図で表した行列が挙げられる。これを用いると、例えば、各行列要素のベクトル線が示す方向が交差又は収束する位置（波長座標）に特異点が存在すると特定される。

【0030】

或いは、解析・分類工程においては、種類の判明している特定の疾患を有する生体からの基準検体を用いて予め検出された特異点の既知の属性と、判定対象の検体に対して得た特異点の属性とを比較し、その比較結果に基づいて検体の分類を行っても好ましい。

【0031】

こうすれば、例えば特定の疾患のうち更に疾患部位の異なる検体毎に得られた三次元光スペクトルに顯れた特異点の属性を予め用意しておき、その既知の特異点の属性と、被験者の検体に対して検出される特異点の属性を直接的に対比する

ことにより、検体のより詳細な分類を迅速に実施できる。

【0032】

また、本発明は、特定の疾患が悪性腫瘍である場合に特に有用である。この場合、液性調整工程においては、検体の液性をアルカリ性に保持することが特に望ましい。

【0033】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。図1は、本発明による疾患判定方法の好適な一実施形態を実施する手順を示すフロー図である。

【0034】

(尿検体の前処理)

まず、被験者の尿を採取し、尿検体を準備する（ステップSP1）。次いで、尿検体を遠心分離等によって微細な固形分と液分とに分離し、上澄み液を収集する。この上澄み液をネジ付き試験管等の密閉圧力容器に入れ、これに塩酸等の酸を加えて混合し、これを一定温度に加熱しながら一定時間保持することにより、尿検体の上澄み液の酸・加熱処理を行う（ステップSP2；前処理工程）。これにより、上澄み液に含まれる生化学成分の一部又は全部が加水分解等の化学変化を生じ得る。

【0035】

ここで、酸の使用量としては、上澄み液1質量部に対して、例えば6mo1/L（リットル；以下同様）の塩酸を好ましくは0.1～1.0質量部、より好ましくは0.2～5質量部を用いることができる。また、前処理工程における加熱温度は、好ましくは100～200℃、より好ましくは100～160℃とされ、加熱時間は、0.5～5時間であると好ましく、0.7～2時間であるとより好ましい。

【0036】

(尿検体の液性調整)

次に、前処理工程が終了した後、上澄み液を室温に冷却し、一定量の水酸化ナトリウム溶液で適宜希釈し、液性がアルカリ性となるように調整し、蛍光測定用

試料を作成する（ステップSP3；液性調整工程）。このとき、アルカリ濃度は特に制限されず、pH領域の液性（アルカリ性）となっても構わないが、調整の容易さの観点より、例えば水酸化ナトリウムを用いた場合にOHイオン濃度が0.01～2mol/L程度となるようにすると好ましく、より好ましくは0.1～2mol/L程度とされる。

【0037】

(尿検体の蛍光測定)

次いで、石英セル等の蛍光測定用容器に蛍光測定用試料の一定量を入れ、一般に使用される蛍光光度計に収容する。そして、その蛍光測定用試料に所定波長の励起光を照射し（励起光照射工程）、その際に試料から発せられる所定波長の蛍光強度を計測する（出射光計測工程）。これにより、励起光波長、蛍光波長、及び蛍光強度の三次元蛍光スペクトル（三次元光スペクトル）を得る（ステップSP4）。なお、蛍光測定に際しては、試料温度を例えば室温で一定に保持することが望ましい。

【0038】

このとき、励起光としては、好ましくは200～900nm、より好ましくは300～600nmの波長の光を連続的に波長走査して照射すると好適である。これは、上記波長範囲が尿検体に含まれる自家発光成分を一光子励起するのに好適なためである。また、サンプルのより少ないダメージを考慮して、二光子励起させる場合には、より長波長の光を利用することも可能である。その際の励起光としては、好ましくは400～1800nm、より好ましくは600～1200nmの波長の光を連続的に波長走査して照射すると好適である。

【0039】

一方、計測する蛍光の波長範囲としては、好ましくは200～900nm、より好ましくは350～600nmであると好適である。これは、上記好適な波長範囲の励起光による一光子励起に対応する波長であると共に、こうすれば、尿検体に含まれる自家発光成分からの蛍光波長を十分にカバーできる。

【0040】

(データ解析)

次に、得られた三次元蛍光スペクトルのデータ解析を実施する（ステップSP5；解析・分類工程）。図2は、主としてステップSP5における好適な一実施形態を実施する手順（スキーム）を示すフロー図である。ステップSP5においては、まず、形状認識ソフトウェアといった公知のパターン認識手法で認識する（ステップSP51）。具体的には、三次元蛍光スペクトルにおいて蛍光強度が周囲に比して高い部位が存在するか否か、つまり特異点の有無についての予備的な検査を行う。

【0041】

次に、ステップSP51において、引き続き三次元スペクトルデータの加工を行う。これは、ステップSP52以降で実施する特異点の検出を行うための処理である。すなわち、三次元スペクトルの三次元座標系（励起光波長、蛍光波長、及び蛍光強度からなる系）における（1）数値マトリックス、（2）等高線図、又は（3）ベクトル線図から成る特異点検出用マップを作成する。

【0042】

ここで、図3は、数値マトリックスから成る特異点検出用マップの一例を示す模式図であり、図4は、等高線図から成る特異点検出用マップの一例を示す模式図であり、図5は、ベクトル線図から成る特異点検出用マップの一例を示す模式図である。

【0043】

図3に示す特異点検出用マップは、行要素及び列要素をそれぞれ励起光波長Ex (nm) 及び蛍光波長Em (nm) (共に10 nm毎) とする行列の各成分に当該波長座標に対応して計測された蛍光強度の積算値、平均値、又は代表値が表記された 6×5 の二次元マトリックスである。この例では、マトリックス上で周囲の複数の行列成分より数値が大きい極大値が存在し、その波長座標は、図中Pで示す位置、つまり励起光波長Exが320～330 nm (中間値で示すならば325 nm) で且つ蛍光波長Emが370 nmである (以下、波長座標を「Ex／Em=325 nm／370 nm」のように記す。)。そして、この極大ピークPが特異点として特定される (ステップSP52)。

【0044】

図4に示す特異点検出用マップは、図示縦軸を励起光波長E_xとし且つ図示横軸を蛍光波長E_mとする平面座標系において、蛍光強度が等しいと認められる座標を実線で結んで描画した等高線を表す平面線図である。説明を容易にするため、ここでは、図3に示すマトリックスの数値データを基に作成した等高線図の例を示す。この例では、閉じた複数の曲線の内部中心又はその付近、すなわちE_x/E_m=325 nm/370 nmに極大ピークPが存在し、それが特異点として特定される（ステップSP52）。

【0045】

図5に示す特異点検出用マップは、図3に示すマップと同様に構成したマトリックスの行列成分として、図示直線矢印で示すベクトル線が記入された6×5の二次元マトリックスで表されたベクトル線図である。説明を容易にするため、ここでは、図3に示すマトリックスの数値データを基に作成したベクトル線図の例を示す。各ベクトル線は、三次元スペクトルの形状における蛍光強度の増大方向又は減少方向を平面的に表すものであり、図4に示すような等高線図の傾斜方向を表すものもある。この例では、各ベクトル線が指し示す方向の延長線が交差する位置、すなわちE_x/E_m=325 nm/370 nmに極大ピークPが存在し、それが特異点として特定される（ステップSP52）。

【0046】

次に、その特異点の属性を決定し、その属性に基づいて特異点の弁別又はグループ分けを行う。特異点の属性とは、特異点の波長座標（励起光波長E_x/蛍光波長E_m）、特異点の数、特異点における蛍光強度、特異点の周辺における蛍光強度の変化割合、三次元蛍光スペクトルの全体形状（近似関数形、一次微分や二次微分値の変化、極大ピークの半値幅や十分の一幅、ピーク対称性等）が挙げられる。先に図3～図5に示した特異点検出用マップで特定された特異点としての極大ピークPを例にとると、その属性は、波長座標E_x/E_m=325 nm/370 nm、ピーク数=1、蛍光強度=約2000、特異点の周辺における蛍光強度の変化割合=図4に示す等高線図の等高線間隔となる。

【0047】

このように決定された特異点の属性に基づいて、図2に示すステップSP53

では、特異点の数及びその波長座標によって、ある被験者の尿検体に対して特定された特異点と、健常者の尿検体に対して予め特定された特異点との弁別を行う。具体的には、例えば被験者の尿検体で認められる極大ピーク数、及び／又はそのピーク位置（波長座標）が健常者のそれらと異なる場合には、属性の弁別が可能であり、後述するステップSP56へ移行する。それ以外の場合は、特異点の数及びその波長座標による弁別が不能であり、ステップSP54へ処理を移行する。

【0048】

次いで、ステップSP54では、特異点における蛍光強度によって両者の弁別を行う。具体的には、極大ピークの数とピーク位置が同等であっても、両者の極大ピークにおける蛍光強度が有意に異なる場合には、属性の弁別が可能であり、後述するステップSP56へ移行する。それ以外の場合は、特異点の数、その波長座標、及びその蛍光強度による弁別が不能であり、ステップSP55へ処理を移行する。

【0049】

次に、ステップSP55では、特異点近傍の蛍光強度の変化割合、或いは三次元蛍光スペクトルの全体形状によって、両者の弁別を行う。具体的には、極大ピークの数、ピーク位置及びピークの蛍光強度が同等であっても、例えば、図4に示すような等高線図の等高線間隔やパターンにおいて有意な差異が認められる場合には、属性の弁別が可能であり、後述するステップSP56へ移行する。それ以外の場合は、特異点の数、その波長座標、その蛍光強度及び蛍光強度の変化割合等による弁別が不能であり、処理を中止して図1に示すステップSP2を施した尿検体の上澄み液に対し、液性がアルカリ性になるように調整した先ほどのステップSP3に代わって、酸又は緩衝溶液(剤)を用いて液性を酸性または中性若しくは略中性に調整する液性調整処理を施して、再度ステップSP4以降の処理を行うか、或いは後述するステップSP56を飛び越してステップSP6へ処理を移行する。なお、図2においては後者の場合のみ図示した。

【0050】

こうして特異点の属性の弁別が行われた尿検体は、ステップSP3～SP5

5の段階的な弁別スキームに応じて、ステップSP56においてグループ化（分類）及びレベル化（階層化）が行われる。そして、各尿検体の属するグループ及びレベルに応じて、その尿検体が帰属する被験者（生体）に悪性腫瘍等の疾患が存在するか否か、或いは、疾患が存在する場合その状態は如何なるものかといった判定を実施する（ステップSP6；判定工程）。

【0051】

このような本発明の疾患判定方法によれば、尿検体に含有する特定の生化学的指標物質のみを定性・定量するのではなく、前処理を施しただけで化学分離等が行われていない状態の尿検体に励起光を照射し、これにより発せられる蛍光成分を非選択的に測定し、その結果に基づいてデータ解析を行うので、尿検体から得られる情報量が飛躍的に増大する。よって、疾患判定の感度並びに精度及び確度を向上できる。

【0052】

また、このようにして疾患判定の感度並びに精度及び確度が向上されるので、本発明による疾患判定方法は、疾患検出のための一次スクリーニング、特に悪性腫瘍の早期発見に極めて有用である。そして、本発明の疾患判定方法を用いて診断できる原発性又は転移性悪性腫瘍は、極めて多様であり、以下に例示するものをその代表的なものとして挙げることができる。すなわち、乳ガン、前立腺ガン、肝臓ガン、肺ガン、結腸直腸ガン、胃ガン、脾臓ガン、膀胱ガン、頭頸部ガン、腎臓ガン、子宮頸ガン、子宮体ガン、甲状腺ガン、脳腫瘍、舌ガン、リンパ腫、多発性骨髄腫、黒色腫、白血病等である。本発明の疾患判定方法によれば、これらの悪性腫瘍を、種々の進行段階、特に、第一期の段階で判定可能であり、例えば、スクリーニング対象の被験者中の良性腫瘍の存在や悪性腫瘍の不在に対して、悪性腫瘍を十分な識別力で判定できる。

【0053】

さらに、従来の尿分析を用いた疾患判定は、尿に含まれる生化学的指標物質の含有量の絶対値により疾患を検出する手法であり、検体の前処理における希釈操作で生じる希釈誤差や化学収率の誤差の影響で判定精度が低下するおそれがあつたのに対し、本発明では、極大ピークの数、その蛍光強度、三次元スペクトルの

形状等を相対的に比較する手法を用いるので、尿中の生化学的指標物質の絶対量に依存しない判定が可能である。よって、希釈誤差や化学収率の誤差が解消され、判定精度を一層向上できる。

【0054】

加えて、偽陰性率又は偽陽性率を十分に低下させることができ、誤診断が低減される。よって、別の臨床検査と組み合わせてより詳細な検査を行う際に、被験者の負担及び後続の検査負担の軽減に貢献することもできる。また、尿検体に含まれ得る種々の生化学的指標物質の自家発光に起因すると考えられる蛍光を計測し、得られた三次元蛍光スペクトルに認められる特異点を適宜抽出するので、疾患の種類に制限されない疾患判定が可能となる。よって、種々の疾患の判定への適合性を高めることができる。さらに、尿検体から特定成分を単離・精製するといった操作が不要なので、判定作業の迅速化を実現できる利点がある。

【0055】

またさらに、前処理した尿検体を、蛍光計測に適した液性へ調整し、ときには種々の液性に調整した蛍光測定試料の計測結果を相補的に使用するので、疾患判定の感度並びに確度を更に向上させることができる。さらにまた、特異点の検出を行うの際に特異点検出用マップを用いると、三次元蛍光スペクトルの傾向が種々異なる場合にも、特異点の特定が簡易且つ確実となる。加えて、特異点の属性による段階的な弁別を行い、その結果に基づくグループ化やレベル化による検体の分類・階層化を行うので、漏れのない疾患判定が可能となる。

【0056】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0057】

〈実施例1〉

本実施例では、特異点の波長座標と特異点の数による悪性腫瘍の判定を実施した。

(検体の準備)

健常者74名及び悪性腫瘍患者79名から採取した尿検体を併せて153検体準備した。

【0058】

(尿検体の前処理)

全153検体を3000gatで10分間遠心分離した。遠心分離によって得られた尿検体の上澄み液を収集し、その上澄み液の各1mLを、6mol/Lの塩酸2mLを含むネジ付き試験管に封入し、上澄み液成分の加水分解を促進すべく、150℃で1時間加熱処理した。

【0059】

(尿検体の液性調整)

前処理した尿検体の上澄み液各 $10\mu L$ を2mol/LのNaOH溶液及び2mol/LのHClで個別に10倍に希釈し、各検体についてアルカリ性の液性を有する蛍光測定用試料及び酸性の液性を有する蛍光測定用試料をそれぞれ調整した。

【0060】

ここで、両液性の蛍光測定用試料を用いて後述する「蛍光計測」と同様にして予備的に三次元蛍光スペクトルを取得したところ、アルカリ性試料の方が健常者の尿検体と悪性腫瘍患者の尿検体との差異が顕著であった。そこで、以下の結果については、アルカリ性試料の結果のみを示すものとする。ただし、上述した実施形態の説明で言及したように、アルカリ性試料のみならず、酸性試料さらには中性試料の蛍光測定は、互いの計測データの解析を補足する意味で非常に有用である。

【0061】

(蛍光計測)

蛍光計測用の石英セルに液性調整した各蛍光測定用試料を入れ、蛍光光度計（株）日立製作所製；型式F4500を使用し、波長300～600nmの励起光を波長走査しながら照射した。そして、試料から出射される波長350～600nmの蛍光を計測し、三次元蛍光スペクトルを測定した。なお、励起波長及び蛍光波長の走査は、波長10nm間隔で実施した。

【0062】

(三次元蛍光スペクトルにおける特異点の検出)

各検体について得られた三次元蛍光スペクトルデータから、①数値データマトリックスから成る特異点検出用マップ、及び②等高線図から成る特異点検出用マップを作成した。①については、三次元蛍光スペクトルの予備的なパターン認識において把握された蛍光強度の極大ピーク（以下、単に「極大ピーク」と表記する。）周辺の数値データ配列における特異点の定義を、「 3×3 行例の計 9 ピクセル（行列成分）の中心のピクセルが極大となるその波長座標」とし、その関係を満たすものを特異点として特定（抽出）した。

【0063】

また、②については、 $E_x / E_m = 410\text{ nm} / 450\text{ nm}$ における蛍光強度が‘1000’となるように、全波長座標の蛍光強度を規格化し、その規格化後の数値データを用いて等高線図を作成した。図6～9は、それぞれ等高線図から成る特異点検出用マップの一例を示す。各図において、等高線間隔は規格化後の蛍光強度で200間隔とした。図6及び7は、特異点としての極大ピークPが一つ検出された尿検体の例であり、図8及び9は、特異点としての極大ピークPが二つ検出された例である。また、これら図6～9に示す等高線図は、それ自体が三次元蛍光スペクトルの全体形状を表すものである。

【0064】

なお、本実施例においては、 $E_x / E_m = 410\text{ nm} / 450\text{ nm}$ 以外の種々の E_x / E_m における蛍光強度で規格化したマップも作成した。さらに、各尿検体に含まれるクレアチニン濃度を汎用の測定キット（例えば、和光純薬製のLタイプワコー クレアチニンF）で定量し、その濃度で蛍光強度を規格化したマップも作成した。その結果、等高線図形状として、図6～9に示すのと同等パターンの等高線図が得られることを確認した。

【0065】

また、上記①の数値マトリックスから成る特異点検出用マップを用いても、同じ座標位置に極大ピークが存在することが検出された。ただし、上記①の数値マトリックスを用いるとバックグラウンドと極大ピークとの弁別性が若干低下する

ケースがあった。よって、このような場合には、上記①及び②の二種類のマップを複合的に用いることにより、特異点検出におけるS/N比つまり検出感度を向上して極大ピークPを確実に特定するのに有利であることが判明した。なお、特異点検出用マップとして③ベクトル線図から成るものも作成したところ、同様に極大ピークPを検出できることが確認された。

【0066】

(尿検体の分類・階層化)

上述の如く三次元蛍光スペクトルにおける特異点として検出した極大ピークの属性を特定し、各尿検体をグループ分け（分類）した。その結果を表1にまとめて示す。

【0067】

【表1】

	悪性腫瘍患者数	健常者数
検体グループA (P1有り)	16	65
検体グループB (P1無し)	63	9

【0068】

表中P1は下記の波長座標のピークグループを示す。

・ P1 : Ex/E_m = 400 ~ 410 nm / 440 ~ 460 nm

表1に示す結果より、ピークグループP1が存在するか否かに着目することにより、悪性腫瘍患者を高い感度と特異度で判定可能であることが確認された。具体的には、感度が0.80であり、特異度は0.88であった。これは、ペプシノーゲンを指標物質とする胃ガン判定におけるのと同等以上の高い感度及び特異度であることが確認された。なお、ここではピークグループP1の有無により検体グループを分類し、直接悪性腫瘍を判定したが、判定前に他の属性パラメータを利用して階層化を行っておくことも可能である。具体的には、例えばピークグループP1を含めた検出される極大ピークの総数をパラメータとした階層化が可能となる。このようにして階層化した結果を表2及び3に示す。

【0069】

【表2】

検体グループA (P1有り)					
総ピーク数	0	1	2	3	4
悪性腫瘍患者数	0	4	7	3	2
健常者数	0	11	44	6	4

【0070】

【表3】

検体グループB (P1無し)					
総ピーク数	0	1	2	3	4
悪性腫瘍患者数	4	37	16	6	0
健常者数	0	8	1	0	0

【0071】

表2及び3は、それぞれ表1で示した検体グループA及びBに対し、総ピーク数に基づいて階層化を試みた結果を示す。これらの表より、総ピーク数を更なるパラメータとして加えた場合、検体グループAについては階層化が極めて困難である一方で、検体グループBについては階層化が可能であることが確認された。具体的には、検体グループBに属する検体のうち、総ピーク数が0及び3の検体は悪性腫瘍患者のみのものであり（表3参照）、これより検体グループBについての階層化が可能であることが判明した。このような総ピーク数をパラメータの一つとして加えた階層化を上記表1に示す検体グループBに施したところ、表4に示す結果が得られた。

【0072】

【表4】

	悪性腫瘍患者数	健常者数
検体グループA (P1有り)	16	65
検体グループB-1 (P1無し—総ピーク数1又は2)	53	9
検体グループB-2 (P1無し—総ピーク数0又は3)	10	0

【0073】

表4に基づいて悪性腫瘍の判定を行う場合、判定結果（感度、特異度）は表1に基づく場合と大差はないものの、総ピーク数をパラメータとして加えることにより、より高い確度で悪性腫瘍の判定を行い得る。すなわち、表4より、悪性腫瘍患者と判定される検体グループBは、より高い確度で悪性腫瘍と判定される検体グループB-2と、検体グループB-2に比して確度がやや劣る検体グループB-1に階層化できることが理解できる。

【0074】

<実施例2>

本実施例では、特異点の周囲における出射光（蛍光）強度の変化割合による悪性腫瘍の判定を実施した。まず、実施例1と同様して（検体の準備）から（三次元蛍光スペクトルにおける特異点の検出）までの処理を実施した。

【0075】

(尿検体の分類・階層化)

実施例1で示したピークグループP1の代表座標を $E_x/E_m = 410\text{ nm}/450\text{ nm}$ とし、その座標における蛍光強度とその座標の周囲の蛍光強度の比に注目したところ、特に $E_x/E_m = 410\text{ nm}/450\text{ nm}$ の蛍光強度と $E_x/E_m = 400\text{ nm}/480\text{ nm}$ の蛍光強度との比が、健常者と悪性腫瘍患者間で有意に異なることが確認された。その結果を表5に示す。

【0076】

【表5】

	悪性腫瘍患者数	健常者数
検体グループC (蛍光強度比：1100未満)	16	63
検体グループD (蛍光強度比：1100以上)	63	11

【0077】

表5に示す結果より、ピークグループP1の周囲における蛍光強度の変化割合に着目することによっても、実施例1と同等の高い感度と特異度で悪性腫瘍患者を判定できることができることが確認された。具体的には、感度が0.80であり、特異度は0.85であった。以上、実施例1では2つの属性パラメータを使用し、実施例2では単一のパラメータを使用した場合の悪性腫瘍の判定例を示したが、三次元蛍光スペクトルから得られる種々の異なるパラメータを適宜の順序でもって特異点の弁別に用いることにより、検体の系統的な階層分類が実現される。

【0078】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明の疾患判定方法によれば、生体からの検体を用いて悪性腫瘍といった特定の疾患を判定するに際し、その判定精度及び確度を十分に向上できると共に、種々の疾患判定に適用可能であり、併せて判定作業の迅速化をも達成することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明による疾患判定方法の好適な一実施形態を実施する手順を示すフロー図である。

【図2】

ステップSP5における好適な一実施形態の実施手順（スキーム）を示すフロー図である。

【図3】

数値マトリックスから成る特異点検出用マップの一例を示す模式図である。

【図4】

等高線図から成る特異点検出用マップの一例を示す模式図である。

【図5】

ベクトル線図から成る特異点検出用マップの一例を示す模式図である。

【図6】

等高線図から成る特異点検出用マップの一例を示す。

【図7】

等高線図から成る特異点検出用マップの一例を示す。

【図8】

等高線図から成る特異点検出用マップの一例を示す。

【図9】

等高線図から成る特異点検出用マップの一例を示す。

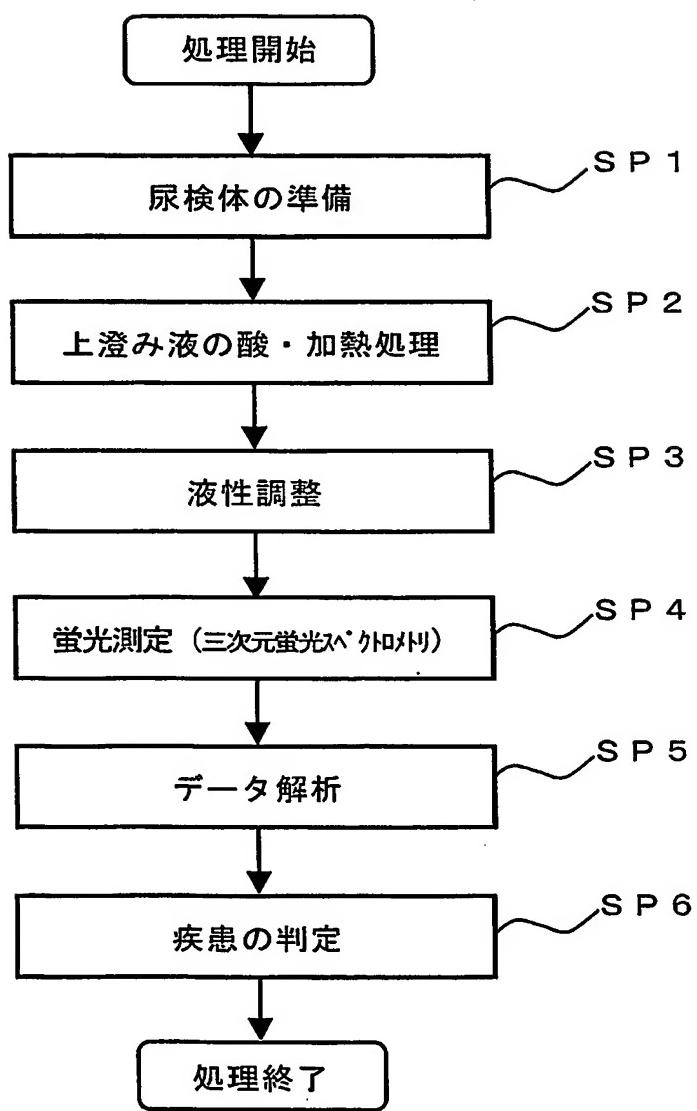
【符号の説明】

P…極大ピーク（特異点）。

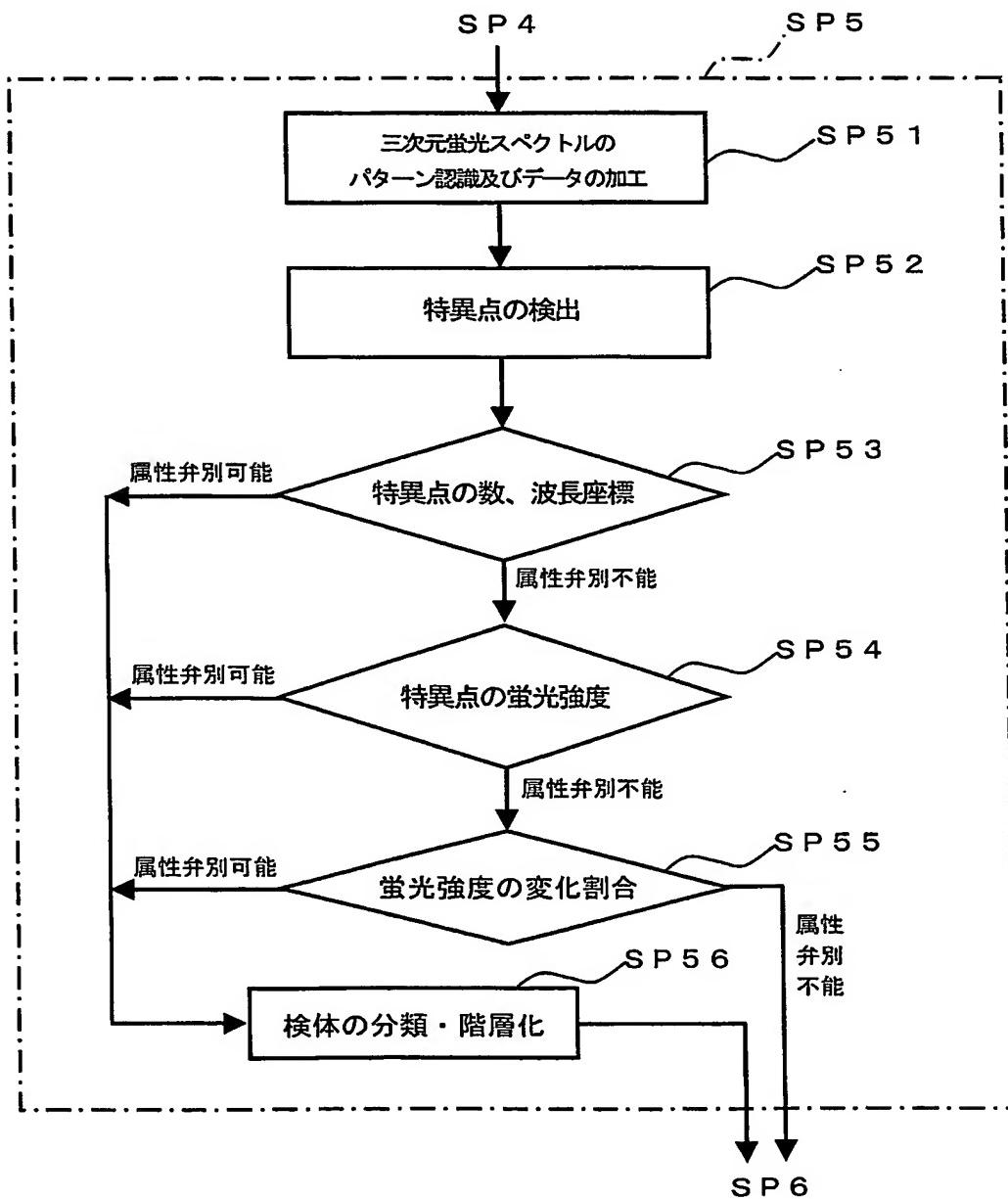
【書類名】

図面

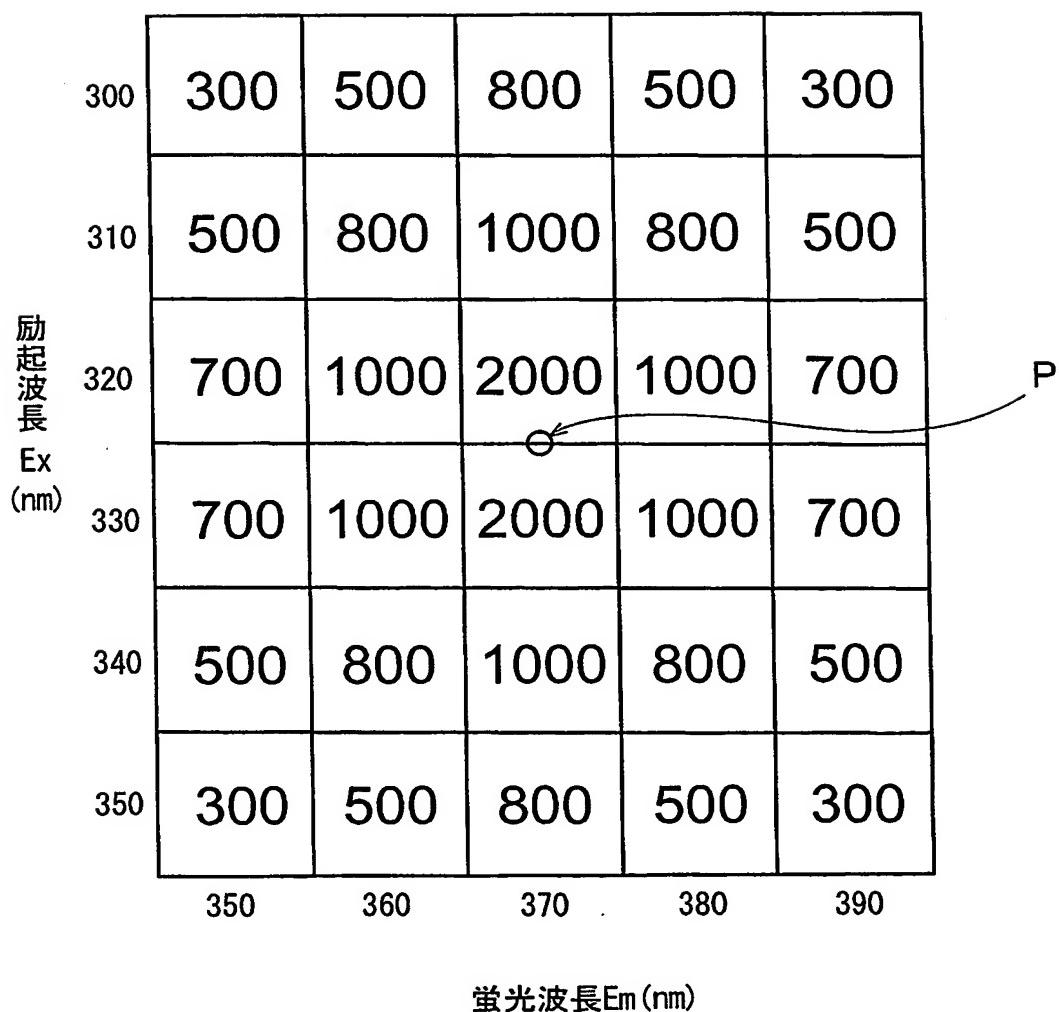
【図1】



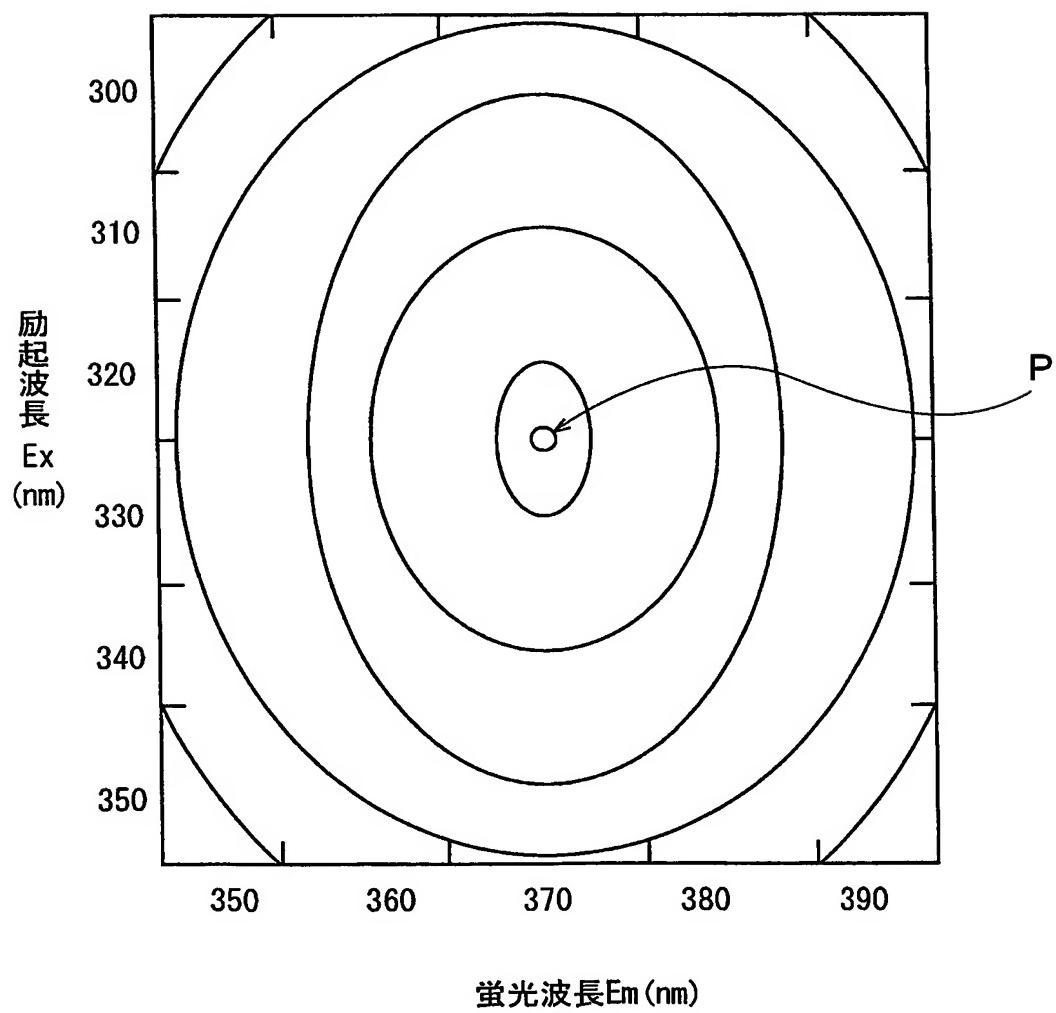
【図2】



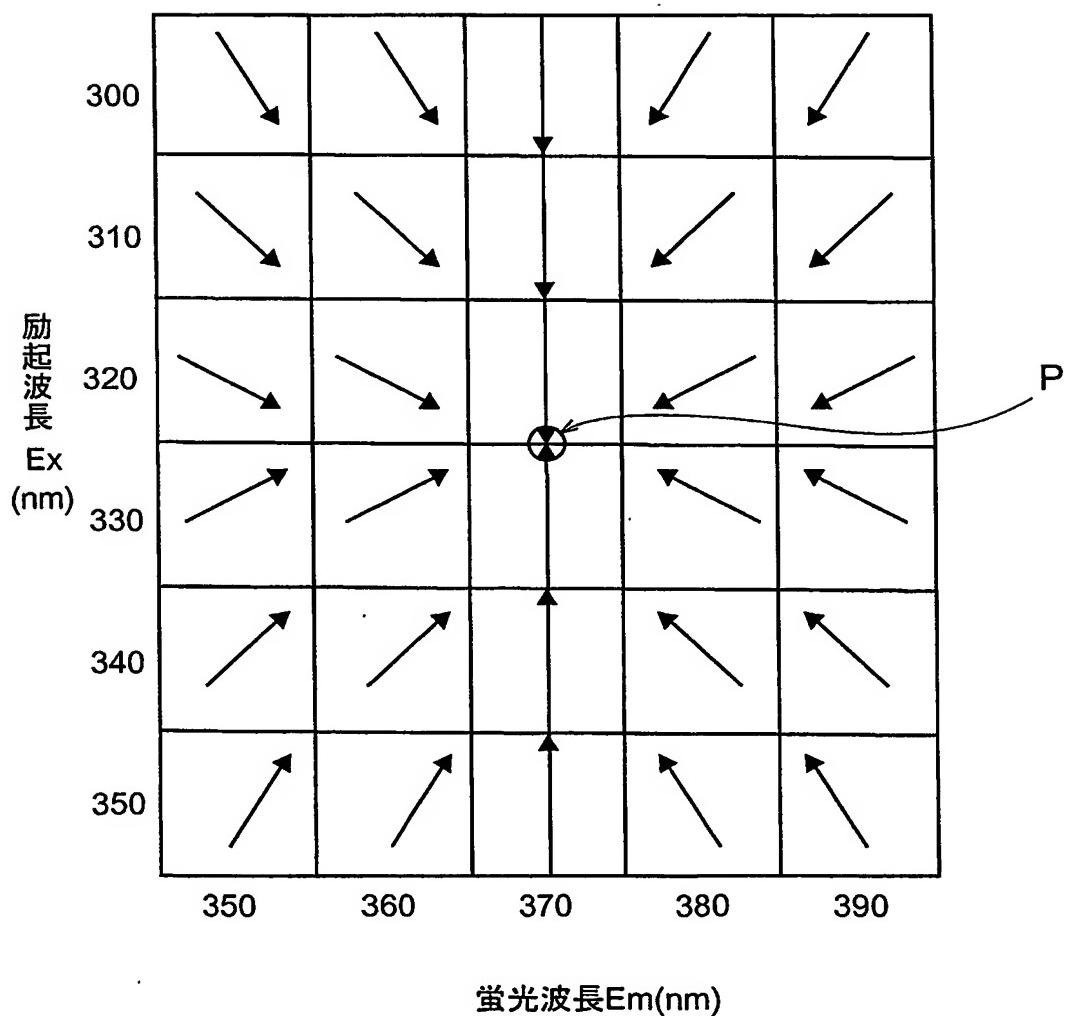
【図3】



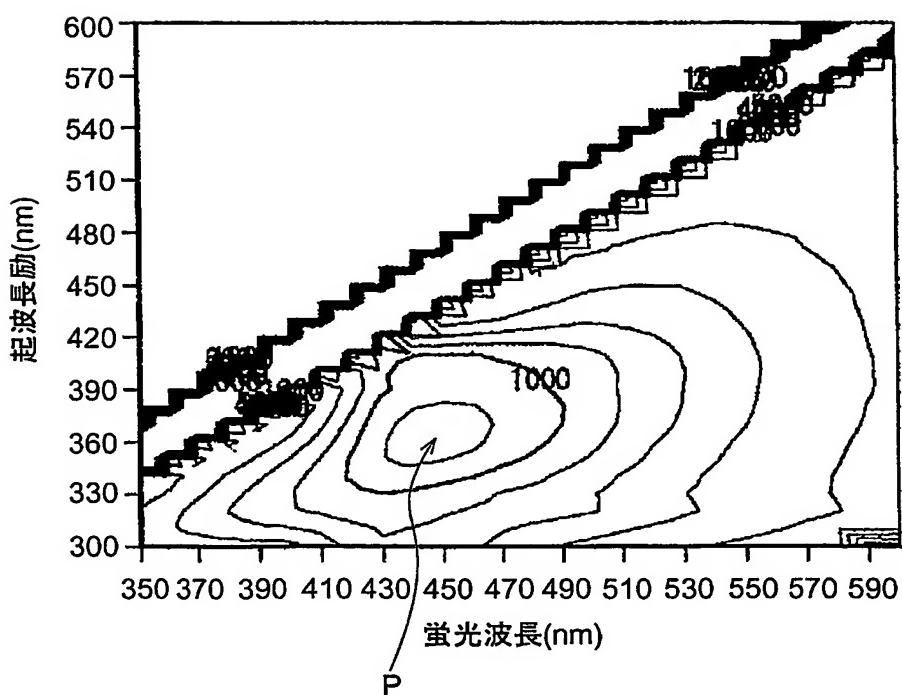
【図4】



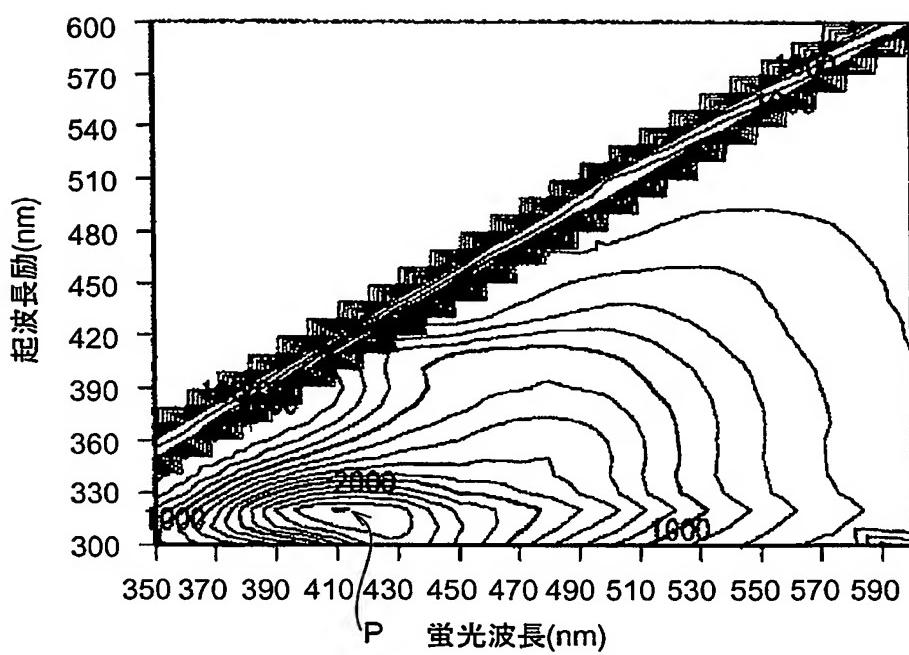
【図5】



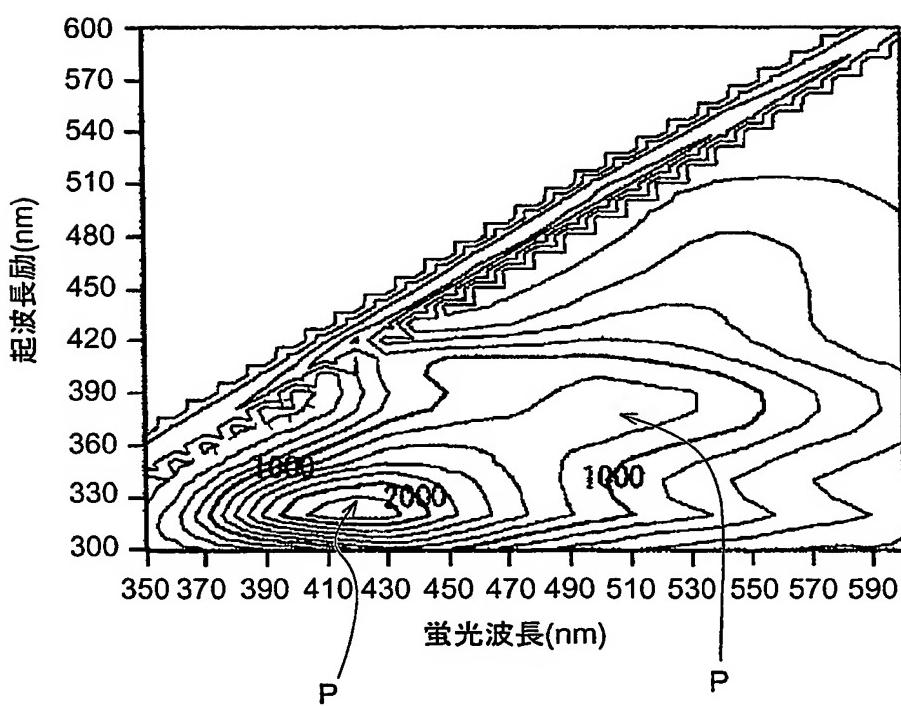
【図6】



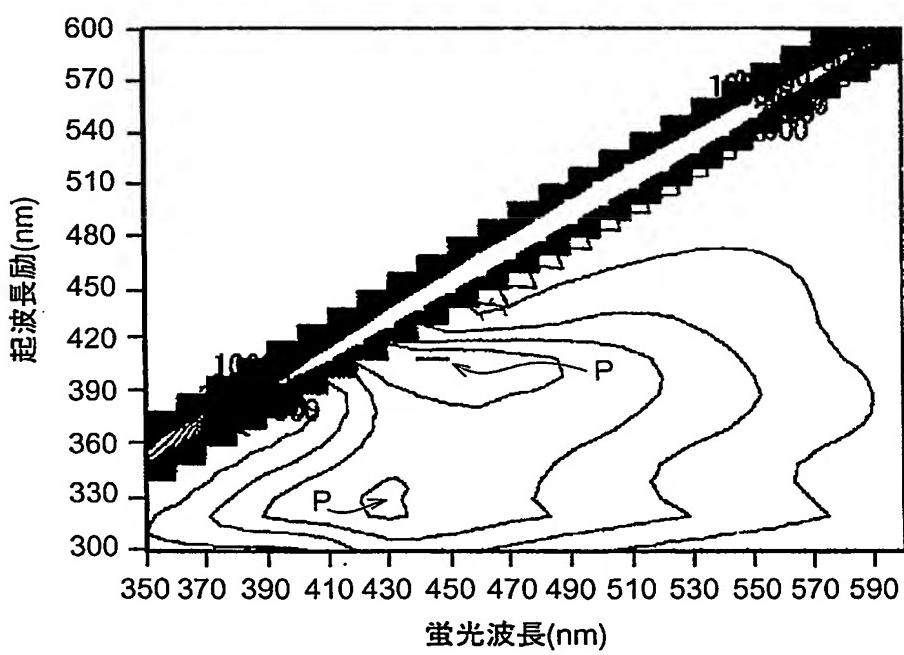
【図7】



【図8】



【図9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生体からの検体を用いた疾患判定において、判定精度を向上でき、種々の疾患に適用でき、しかも、判定作業の迅速化が可能な疾患判定方法を提供する。

【解決手段】 本発明の疾患判定方法においては、準備した尿検体（S P 1）の上澄み液に酸又はアルカリを添加して加熱し（S P 2）、その後、液性をアルカリ性として蛍光計測用試料を作製する（S P 3）。次いで、蛍光光度計を用いて励起光波長、蛍光波長及びその強度から成る三次元蛍光スペクトルを得る（S P 4）。そして、その三次元蛍光スペクトルにおける特異点として極大ピークを検出し、その特異点の属性（ピーク数、ピーク位置、蛍光強度等）を特定し、その属性に基づいて特異点ひいては尿検体の分類を行う（S P 5）。最後に、尿検体の分類結果から悪性腫瘍等の疾患の存在を判定する（S P 6）。

【選択図】 図 1

特願 2002-320044

出願人履歴情報

識別番号 [000236436]

1. 変更年月日 1990年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住所 静岡県浜松市市野町1126番地の1
氏名 浜松ホトニクス株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:



BLACK BORDERS

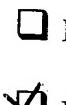
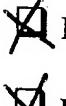


IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES



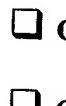
FADED TEXT OR DRAWING



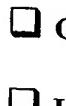
BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING



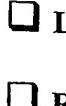
SKEWED/SLANTED IMAGES



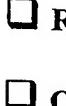
COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS



GRAY SCALE DOCUMENTS



LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT



REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY



OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.